

# 記録原本

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	PCT/JP 01/06660
国際出願日	02.08.01
(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	BOF-3887PCT

## 第I欄 発明の名称

殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、有害生物防除剤及び防除方法

## 第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

浅野 真一郎 ASANO Shinichiro  
〒060-0809 日本国北海道札幌市北区北9条西9丁目  
北海道大学大学院農学研究科内  
c/o Graduate School of Agriculture Hokkaido University,  
Kita 9-jo Nishi 9-chome, Kita-ku, Sapporo-shi,  
HOKKAIDO 060-0809 JAPAN

☒ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

## 第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

山中 聡 YAMANAKA Satoshi  
〒300-2646 日本国茨城県つくば市緑ヶ原2丁目1番  
株式会社エス・ディー・エス バイオテック つくば研究所内  
c/o Tsukuba Laboratory, SDS Biotech K. K.,  
1, Midorigahara 2-chome, Tsukuba-shi,  
IBARAKI 300-2646 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

## 第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

8108 弁理士 大家 邦久 OHIE Kunihiisa  
8871 弁理士 千葉 博史 CHIBA Hiroshi

電話番号:

03-3669-7714

ファクシミリ番号:

03-3669-5408

加入電話番号:

〒103-0013 日本国東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号  
堀口第2ビル7階 大家特許事務所  
OHIE Patent Office, Horiguchi No. 2 Bldg. 7F, 2-6,  
Nihonbashi-Ningyocho 2-chome, Chuo-ku, TOKYO 103-0013 JAPAN

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

武内 克義 TAKEUCHI Katsuyoshi  
〒300-2646 日本国茨城県つくば市緑ヶ原2丁目1番  
株式会社エス・ディー・エス バイオテック つくば研究所内  
c/o Tsukuba Laboratory, SDS Biotech K. K.,  
1, Midorigahara 2-chome, Tsukuba-shi,  
IBARAKI 300-2646 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：

- ☐ 出願人のみである。
- ☒ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

- ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

- ☐ 出願人のみである。
- ☐ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

- ☐ 出願人のみである。
- ☐ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

- ☐ 出願人のみである。
- ☐ 出願人及び発明者である。
- ☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

## 第Ⅴ欄 国の指定

(該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う。ほかの種類の保護又は取扱をいずれかの指定国（又は OAPI）で求める場合には追記欄に記載する。

## 広域特許

- ☐ **A P** **ARIPO**特許：GHガーナ Ghana, GMガンビア Gambia, KEケニア Kenya, LSレソト Lesotho, MWマラウイ Malawi, MZモザンビーク Mozambique, SDスーダン Sudan, SLシエラ・レオネ Sierra Leone, SZスワジランド Swaziland, TZタンザニア United Republic of Tanzania, UGウガンダ Uganda, ZWジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ **E A** ユーラシア特許：AMアルメニア Armenia, AZアゼルバイジャン Azerbaijan, BYベラルーシ Belarus, KGキルギスタン Kyrgyzstan, KZカザフスタン Kazakhstan, MDモルドヴァ Republic of Moldova, RUロシア Russian Federation, TJタジキスタン Tajikistan, TMトルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ **E P** ユーロップ特許：ATオーストリア Austria, BEベルギー Belgium, CH and LIスイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CYキプロス Cyprus, DEドイツ Germany, DKデンマーク Denmark, ESスペイン Spain, FIフィンランド Finland, FRフランス France, GB英国 United Kingdom, GRギリシャ Greece, IEアイルランド Ireland, ITイタリア Italy, LUルクセンブルグ Luxembourg, MCモナコ Monaco, NLオランダ Netherlands, PTポルトガル Portugal, SEスウェーデン Sweden, TRトルコ Turkey, 及びユーロップ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ **O A** **OAPI**特許：BFブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJベナン Benin, CF中央アフリカ Central African Republic, CGコンゴ Congo, CIコートジボアール Côte d'Ivoire, CMカメルーン Cameroon, GAガボン Gabon, GNギニア Guinea, GWギニア・ビサウ Guinea-Bissau, MLマリ Mali, MRモーリタニア Mauritania, NEニジェール Niger, SNセネガル Senegal, TDチャド Chad, TGトーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国であり特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線の上に記載する）

## 国内特許（他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- |                                                                                                |                                                                                                        |                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> <b>A E</b> アラブ首長国連邦<br>United Arab Emirates                           | <input type="checkbox"/> <b>G E</b> グルジア Georgia                                                       | <input type="checkbox"/> <b>M W</b> マラウイ Malawi                            |
| <input type="checkbox"/> <b>A G</b> アンティグア・バーブーダ<br>Antigua and Barbuda                        | <input type="checkbox"/> <b>G H</b> ガーナ Ghana                                                          | <input type="checkbox"/> <b>M X</b> メキシコ Mexico                            |
| <input type="checkbox"/> <b>A L</b> アルバニア Albania                                              | <input type="checkbox"/> <b>G M</b> ガンビア Gambia                                                        | <input type="checkbox"/> <b>M Z</b> モザンビーク Mozambique                      |
| <input type="checkbox"/> <b>A M</b> アルメニア Armenia                                              | <input type="checkbox"/> <b>H R</b> クロアチア Croatia                                                      | <input type="checkbox"/> <b>N O</b> ノルウェー Norway                           |
| <input type="checkbox"/> <b>A T</b> オーストリア Austria                                             | <input type="checkbox"/> <b>H U</b> ハンガリー Hungary                                                      | <input type="checkbox"/> <b>N Z</b> ニュー・ジーランド New Zealand                  |
| <input type="checkbox"/> <b>A U</b> オーストラリア Australia                                          | <input type="checkbox"/> <b>I D</b> インドネシア Indonesia                                                   | <input type="checkbox"/> <b>P L</b> ポーランド Poland                           |
| <input type="checkbox"/> <b>A Z</b> アゼルバイジャン Azerbaijan                                        | <input type="checkbox"/> <b>I L</b> イスラエル Israel                                                       | <input type="checkbox"/> <b>P T</b> ポルトガル Portugal                         |
| <input type="checkbox"/> <b>B A</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                       | <input type="checkbox"/> <b>I N</b> インド India                                                          | <input type="checkbox"/> <b>R O</b> ルーマニア Romania                          |
| <input type="checkbox"/> <b>B B</b> バルバドス Barbados                                             | <input type="checkbox"/> <b>I S</b> アイスランド Iceland                                                     | <input type="checkbox"/> <b>R U</b> ロシア Russian Federation                 |
| <input type="checkbox"/> <b>B G</b> ブルガリア Bulgaria                                             | <input type="checkbox"/> <b>J P</b> 日本 Japan                                                           | <input type="checkbox"/> <b>S D</b> スーダン Sudan                             |
| <input type="checkbox"/> <b>B R</b> ブラジル Brazil                                                | <input type="checkbox"/> <b>K E</b> ケニア Kenya                                                          | <input type="checkbox"/> <b>S E</b> スウェーデン Sweden                          |
| <input type="checkbox"/> <b>B Y</b> ベラルーシ Belarus                                              | <input type="checkbox"/> <b>K G</b> キルギスタン Kyrgyzstan                                                  | <input type="checkbox"/> <b>S G</b> シンガポール Singapore                       |
| <input type="checkbox"/> <b>B Z</b> ベリーズ Belize                                                | <input type="checkbox"/> <b>K P</b> 北朝鮮<br>Democratic People's Republic of Korea                       | <input type="checkbox"/> <b>S I</b> スロヴェニア Slovenia                        |
| <input type="checkbox"/> <b>C A</b> カナダ Canada                                                 | <input type="checkbox"/> <b>K R</b> 韓国 Republic of Korea                                               | <input type="checkbox"/> <b>S K</b> スロヴァキア Slovakia                        |
| <input type="checkbox"/> <b>C H and L I</b><br>スイス及びリヒテンシュタイン<br>Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> <b>K Z</b> カザフスタン Kazakhstan                                                  | <input type="checkbox"/> <b>S L</b> シエラ・レオネ Sierra Leone                   |
| <input type="checkbox"/> <b>C N</b> 中国 China                                                   | <input type="checkbox"/> <b>L C</b> セント・ルシア Saint Lucia                                                | <input type="checkbox"/> <b>T J</b> タジキスタン Tajikistan                      |
| <input type="checkbox"/> <b>C O</b> コロンビア Colombia                                             | <input type="checkbox"/> <b>L K</b> スリ・ランカ Sri Lanka                                                   | <input type="checkbox"/> <b>T M</b> トルクメニスタン Turkmenistan                  |
| <input type="checkbox"/> <b>C R</b> コスタリカ Costa Rica                                           | <input type="checkbox"/> <b>L R</b> リベリア Liberia                                                       | <input type="checkbox"/> <b>T R</b> トルコ Turkey                             |
| <input type="checkbox"/> <b>C U</b> キューバ Cuba                                                  | <input type="checkbox"/> <b>L S</b> レソト Lesotho                                                        | <input type="checkbox"/> <b>T T</b> トリニダード・トバゴ<br>Trinidad and Tobago      |
| <input type="checkbox"/> <b>C Z</b> チェコ Czech Republic                                         | <input type="checkbox"/> <b>L T</b> リトアニア Lithuania                                                    | <input type="checkbox"/> <b>T Z</b> タンザニア<br>United Republic of Tanzania   |
| <input type="checkbox"/> <b>D E</b> ドイツ Germany                                                | <input type="checkbox"/> <b>L U</b> ルクセンブルグ Luxembourg                                                 | <input type="checkbox"/> <b>U A</b> ウクライナ Ukraine                          |
| <input type="checkbox"/> <b>D K</b> デンマーク Denmark                                              | <input type="checkbox"/> <b>L V</b> ラトヴィア Latvia                                                       | <input type="checkbox"/> <b>U G</b> ウガンダ Uganda                            |
| <input type="checkbox"/> <b>D M</b> ドミニカ Dominica                                              | <input type="checkbox"/> <b>M A</b> モロッコ Morocco                                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>U S</b> 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> <b>D Z</b> アルジェリア Algeria                                             | <input type="checkbox"/> <b>M D</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                          | <input type="checkbox"/> <b>U Z</b> ウズベキスタン Uzbekistan                     |
| <input type="checkbox"/> <b>E E</b> エストニア Estonia                                              | <input type="checkbox"/> <b>M G</b> マダガスカル Madagascar                                                  | <input type="checkbox"/> <b>V N</b> ベトナム Viet Nam                          |
| <input type="checkbox"/> <b>E S</b> スペイン Spain                                                 | <input type="checkbox"/> <b>M K</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア<br>共和国 The former Yugoslav Republic of<br>Macedonia | <input type="checkbox"/> <b>Y U</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia                    |
| <input type="checkbox"/> <b>F I</b> フィンランド Finland                                             | <input type="checkbox"/> <b>M N</b> モンゴル Mongolia                                                      | <input type="checkbox"/> <b>Z A</b> 南アフリカ共和国 South Africa                  |
| <input type="checkbox"/> <b>G B</b> 英国 United Kingdom                                          |                                                                                                        | <input type="checkbox"/> <b>Z W</b> ジンバブエ Zimbabwe                         |
| <input type="checkbox"/> <b>G D</b> グレナダ Grenada                                               |                                                                                                        |                                                                            |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである。

- |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。但し、追記欄にこの宣言から除外旨の表示をした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

第VI欄 優先権主張				
他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載される				
先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 03. 08. 00	特 願 2000-236140	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☐ 上記 ( ) の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証書を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

### 第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択	先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）
ISA / JP	出願日（日. 月. 年） 出願番号 国名（又は広域官庁）

### 第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。
願書 ..... 4 枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙
明細書（配列表を除く）..... 21 枚	<input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
請求の範囲 ..... 2 枚	<input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
要約書 ..... 1 枚	2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状
図面 ..... 1 枚	3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し
明細書の配列表 ..... 17 枚	4. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書
合 計 ..... 46 枚	5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）
	6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
	7. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
	8. <input checked="" type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
	9. <input checked="" type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する）

陳述書・フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

### 第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

大家 邦 久

千葉 博 史



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	受理官庁記入欄 02.08.01	2. 図面
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）		<input type="checkbox"/> 受理された
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 不足図面がある
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない

### 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日	17 AUG 2001
様式PCT/RO/101（最終用紙）（1998年7月：再版2000年7月）	

(17.08.01)

## 明細書

殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、有害生物防除剤  
及び防除方法

5

### 技術分野

本発明は、殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、有害生物防除剤及び防除方法、並びに新規なバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリアSDS502 (Bacillus thuringiensis serovar galleriae SDS502、以下SDS502と略記することがある。) 株に関する。

10

### 背景技術

バチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis、以下Btと略記することがある。) は、他のBacillus属細菌と同様に内生孢子を形成する。この孢子は適当な栄養成分の存在のもとで、発芽し、栄養細胞へと成長する。栄養細胞は、次々に細胞分裂を繰り返し、やがて栄養成分の枯渇や環境の変化などにより、細胞内で内生孢子と結晶蛋白質(Crystal protein)を形成する孢子囊に変化する。更に細胞は崩壊して内生孢子と結晶蛋白質は菌体外に遊離する。

15

Btの産生するこの芽胞及び結晶蛋白質を昆虫が摂食し、消化管の中腸に到達した時、この蛋白質は消化液の強アルカリ条件下で、溶解してプロトキシンとなり、ついで蛋白質分解酵素により活性成分(トキシン)に変化する。この活性成分は中腸上皮細胞の受容体に結合し、その付近の細胞を損傷させる。そして損傷した部分において消化液と体液が混ざり合い、体内の浸透性やpHが変化する。その結果、昆虫の食物消化機能が乱れ、口器の麻痺を引き起こし、摂食活動が低下する。さらに、芽胞が栄養条件下で発芽し、栄養細胞が増殖すると共に昆虫の血体腔内に侵入し、敗血症を引き起こす。

20

25

昆虫種によって感受性は異なるが、通常B t を摂食して数時間で摂食活動は停止し、2～3日後には死亡する。B t 処理後に生存虫がいても食害が少ないのはこの現象による。多くの合成殺虫剤は、昆虫の神経系に作用するため、激しいけいれんやノックダウン効果、麻痺などの現象が見られるが、B t の作用機作は上記のように全く異なり、処理後に生存虫がいても徐々に効果が発現されてくる。このB t 並びにB t の産生する殺虫活性を示す蛋白質（結晶性毒素蛋白質）は、環境を汚染しない微生物農薬（B t 剤）として、特に鱗翅目害虫に対する殺虫剤として非常に有用であり、実際に世界各国で使用されている。

- 10 B t は、グラム陽性の桿状菌で対数増殖末期の孢子形成期に結晶蛋白質を産生する。この結晶蛋白質は、昆虫が経口的に消化管内に取り入れたとき、消化液中でアルカリ分解、酵素分解を受けてはじめて腸管麻痺並びに全身麻痺を伴う殺虫活性を示す蛋白質となるが、哺乳類に対しては毒性を示さない。

- 15 B t の産生する結晶蛋白質は、芽胞囊内で、芽胞とならんで形成され、芽胞囊の時期を経て芽胞とともに菌体外に遊離する（Nature, 172, 1004, 1953）。これらは、一般にダイヤモンド型（diamond-shaped）、重ピラミッド型（bipyramidal）、偏菱形立方体（rhomboidal）等の複雑な結晶体を構成しており、水に不溶性である。孢子形成時に通常1個ずつ産生され菌体の崩壊に伴って孢子とともに培地中に放出される。通常立体的な菱形や斜方晶形構造をして  
20 おり、長辺2.0 $\mu$ 、短辺0.6 $\mu$ 程度の大きさであるが、亜種の場合は不定形のものなどあり、大きさも形状も様々である。また表面には規則性の縞構造が見られる。培地からの結晶蛋白質の分離及び精製は、二層分画法または密度勾配遠心法などで行なわれる。

- 25 結晶蛋白質は、pH 12以上のNaOH溶液に可溶であり、SDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）による分析により、バチルスチューリンゲンシス（Bacillus thuringiensis）に属する菌株では130～135 kDa前後、65 kDa前後及び80 kDa前後の3つの蛋白質が認めら

れる。これらは、C r y 1 蛋白、C r y 2 蛋白、C r y 5 蛋白と総称されている。更にこれらは液体高速クロマトグラフィーなどの分画操作によりほぼ近似する分子量ではあるが部分的に異なる複数の蛋白質に分離できる。すなわち、C r y - 1 蛋白の場合は、さらにC r y - 1 A a、C r y 1 A b等の  
5 蛋白質に分類される。

B t は、1911年ドイツ人研究者ベルリナー (Berliner) により、スジコナマダラメイガ幼虫から分離された。この幼虫がチューリンジア地方から来た粉を食害したために、チューリンゲンシス (Thuringensis) と命名された。また、それより古く1901年石渡博士が同一菌種をカイコの病原性細菌として  
10 分離しており、古くから全世界規模で自然界で存在していることが分かる。例えば、貯穀害虫が生息する貯穀倉庫、製粉所などに存在し、また穀物を輸送する貨車や船室等からも検出され、世界の至る所に移動していることも分かっている。日本においても各地における分布が調べられ、養蚕農家の塵埃中、植物体上等から多くのバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuri  
15 ngiensis) が分離されている。

バチルス (Bacillus) 属に含まれる細菌は70種以上に及ぶが、全世界的に自然界で頻繁に認められるのは、22種である。チエリィ及びフランソン (Thiery and Frachon) の手法により、これらは基本的に孢子形成能及び孢子の形状、糖からのガスの産生、アセチルメチルカルビノール (AMC) の  
20 産生、硝酸塩の還元、いくつかの糖の資化性によって区別され、バチルス・チューリンゲンシス (B. thuringiensis) は最終的に殺虫活性を有する結晶蛋白質の有無により近縁種と区別することができる (「Manual of techniques in insect pathology」 L. Lacey ed. Academic press, California, 55-77. (1997))。

25 バチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) と他の細菌種及びバチルス (Bacillus) 属に含まれる他の菌種との区別に用いられる特徴は、グラム陽性桿菌、カタラーゼ (+)、孢子形成 (+) 卵形孢子、栄養細

胞の幅  $0.9\mu$  以上、アセチルメチルカルピノールの産生 (+)、通性嫌気性、D-マンニトールの資化 (-)、結晶蛋白質の存在 (+) である。

B t の亜種の同定には、40 年もの間、細菌の鞭毛に対するウサギの血清中の抗体を用いるドウ バルジャ及びボンフォア (De Barjac and Bonefoi) 5 ) らの血清学的手法による鞭毛抗原 (H-antigen) が用いられている (Entomophaga 7, 5-31, 1962)。これは、バシルス・チューリンゲンシス (B. thuringiensis) の系統分類に対し、広く利用されている手法である。

これら菌株の殺虫活性は亜種によって異なっており、極めて特異性の高いものとなっている。例えば、鱗翅目昆虫に活性を示す亜種としてクルスタキ 10 (kurustaki)、アイザワイ (aizawai) 等が、又鞘翅目昆虫に活性を示す亜種としてテネブリオニス (tenebrionis)、ヤポネンシス (japonensis) 等が知られている。

しかし、実際には同じ亜種でも菌株ごとに殺虫活性スペクトラムは異なっており、一部の鱗翅目害虫に活性を示す B t 株では害虫の抵抗性が生じてい 15 る。また、鞘翅目昆虫に有効な活性を示す菌株の報告は非常に少ない。

このように B t 剤に抵抗性の生じた鱗翅目害虫に対しても効果のある新規な B t 剤が求められている。更に、鞘翅目昆虫に対して活性を有する B t 剤に対する需要も高い。この中で、鞘翅目昆虫の幼虫特にコガネムシ幼虫に対して殺虫活性を有する新規 B t 剤はこれまでのところバシルス・チューリン 20 ゲンシス・セロバー・ジャポネンシス・ストレイン・ブイブイ (Bacillus thuringiensis Sero var. japonensis strain buibui) 株 (特開平 6-65292、特開平 7-179) 及びバシルス・チューリンゲンシス・バー・ジャポネンシス N141 (Bacillus thuringiensis var. japonensis N141) (特開平 8-228783) 株が報告されているに過ぎない。

25

#### 発明の開示

コガネムシ類幼虫であり、特にシバ、サトイモ、サツマイモ、ラッカセイ



等の大害虫であるドウガネブイブイの幼虫やシバ草害虫であるセマダラコガネ、マメコガネなどの害虫に対し、従来の亜種ヤポネンシスに属するブイブイ株あるいはN 1 4 1 株は十分な効果を示していない。さらに、同様の昆虫種に対して同じ菌種（亜種）に属するB t トキシンは、一部において抵抗性  
5 が発達すると、交差性を示し、その効果は著しく低下する。一方、これらのB t トキシンも効果発現には時間を要し、より強力な殺虫活性を有する新規トキシンの発見が熱望されている。

従って、本発明の課題は、鞘翅目昆虫幼虫に対し高い殺虫活性を示す殺虫性蛋白質を産生する新規なバチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレ  
10 リア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) に属する新菌種を提供し、その新規微生物に由来する殺虫活性を有する蛋白質を提供することにある。

さらに本発明の課題は、前記殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質を構成するアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置換された配列を有  
15 し同様の殺虫活性を示す蛋白質、それらアミノ酸配列をコードするDNA、それらのDNAを用いて形質転換され殺虫活性を示す蛋白質を生産する微生物、それらのDNAを用いて形質転換された植物またはその種子、並びに有害生物防除剤及び防除方法を提供することにある。

## 20 図面の簡単な説明

図1はバチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリアSDS 5 0 2株電子顕微鏡写真である。

図2は本発明の殺虫活性を有する結晶蛋白質のSDS-PAGE結果を示す図である。1はマーカであり、上から200、116.25、97.4、66.2、45.0  
25 kDaを示す。2は大腸菌で発現させたcry SDS 5 0 2遺伝子産物の結果であり、3はSDS 5 0 2結晶蛋白質の結果である。

図3はバチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus t

thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 遺伝子とベクターの連結図  
(遺伝子カセット) である。

#### 発明の詳細な説明

5      本発明者らは、鞘翅目昆虫の幼虫に高い効果を示す新規微生物を検出すべく、多くの土壌について分析を重ね、バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) に属し、鞘翅目幼虫に対する高い殺虫性毒素蛋白質を産生する能力を有する新規微生物  
10   バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 株を見出し、この新規なバチルス・  
チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア SDS 502 (Bacillus thuringiensis serovar galleriae SDS502) 自身及び／またはそれが産生する殺虫性蛋白質 (毒素蛋白質) を有効成分として含有する殺虫剤に係る本発明に到達した。

15      また、本発明の新規微生物が産生する殺虫性蛋白質をコードしている DNA、その DNA にコードされたアミノ酸配列を有する蛋白質及びその蛋白質を有効成分として含有する有害生物防除剤が害虫防除手段として有効であることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の(1) 殺虫活性を示す蛋白質、(2) それらの蛋白質をコードする DNA、(3) 有害生物防除剤及び(4) 植物保護方法、(5) 前  
20   記 DNA を用いて形質転換された(5-1) 微生物、(5-2) 植物またはその種子、並びに(6) 新規微生物に関する。

- 1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し、殺虫活性を示す蛋白質。
- 2) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置  
25   換された配列を有し、殺虫活性を示す蛋白質。
- 3) 前記 1 記載の蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA。
- 4) 配列番号 2 に示す塩基配列を含む前記 3 に記載の DNA。

- 5) 前記2に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA。
- 6) 配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する、(1-1) バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502株、(1-2) その変異株、(1-3) 配列番号
- 5 1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を含むDNAで形質転換された微生物を含むか、または(2-1) 前記SDS502株、(2-2) その変異株または(2-3) 形質転換された微生物が生産する殺虫活性を有する蛋白質を含むことを特徴とする有害生物防除剤。
- 7) 前記5に記載のDNAを用いて形質転換され前記2に記載の殺虫活性を示す蛋白質を生産する微生物。
- 10 8) 前記3または前記5に記載のDNAを用いて形質転換された植物またはその種子。
- 9) 前記1または2に記載の蛋白質を有害生物に摂食させることにより、その有害生物により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。
- 15 10) 前記9に記載の有害生物が鞘翅目害虫であり、その害虫により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。
- 11) 配列番号1に示すアミノ酸配列を有し殺虫活性を示す蛋白質を生産するバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502株。
- 20 本発明の新規なバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502は、独立行政法人産業技術総合研究所に受託番号FERM BP-7667として国際寄託されている。

SDS502株は、一般細菌の生育可能な培地を用い、通常の発酵手法を用いて培養が可能である。

25

培地としては、普通ブイヨン培地（肉エキス 0.3%、ペプトン 1.0%、NaCl 0.5%、pH 7.0）、MBS培地（KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7%、バクトトリブ

トース 1% 酵母エキス 0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.02%、pH 7.2)、MRVP 培地 (ポリペプトン 0.5%、グルコース 0.5%、NaCl 0.5%、pH 7.0) などが挙げられる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、サッカロース、マルトース、  
5 糖蜜、可溶性デンプン、コーンスターチなどが利用できる。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、酵母エキス、ペプトン、大豆粉、カゼインなどが利用できる。

さらに、その他の無機塩類、ビタミンなどとして、 $NaH_2PO_4$ 、 $K_2HPO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $MgSO_4$ 、NaCl、糖蜜、酵母エキス、  
10 エビオス (ビタミン剤) などを添加することが好ましい。pH は 6 ~ 8 が好ましく、培養温度は 25 ~ 33℃ が好ましく、培養時間は 24 ~ 120 時間が好ましい。培養方法は、通気攪拌培養等の好気的条件によるものが好ましい。

培養後、培養液から殺虫性結晶蛋白質を分離する場合、通常の遠心分離法、  
15 濾過法等が利用できる。また、SDS 502 株及び／または SDS 502 株が産生する結晶蛋白質を、栄養細胞及び／または孢子から分離せず、混在した形で使用することもできる。

また、上記 SDS 502 株を元菌株として自然または誘発突然変異により、上記菌株と同様に殺虫性結晶蛋白質を生産する変異株を得て、本発明による  
20 殺虫性結晶蛋白質生産菌として用いることができる。これらの変異株を調整する方法としては、従来知られている慣用の方法、例えば元菌株を紫外線照射あるいは N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の薬剤による人工突然変異処理を施して、スキムミルク等を含む寒天培地に  
25 広げ、生育してくる菌株の中からコロニーのまわりに形成されるクリアゾーンがより大きいコロニーを選抜し、生産性の優れた菌株を選別する方法を用いることができる。

SDS 502 株及び／または SDS 502 結晶蛋白質を有効成分とした有

害生物防除剤を作成する場合、一般農薬と同様に水和剤、粒剤、粉剤、フロアブル剤などの任意な剤型として作成することができる。これらは、それぞれの剤型にふさわしい担体、例えば、ロウ石、タルク、カオリン、炭酸カルシウム、ベントナイト、珪石粉、石灰石粉末、酸性白土、珪藻土類粉末、石膏、軽石粉末、貝殻類粉末、雲母粉末、コロイド性含水珪酸ソーダなどの鉱物質粉末、水、緩衝液などの水溶液と混用して用いられ、好ましくは、アルキルベンゼンスルホネート、アルキルスルホネート等の固着剤、ポリオキシエチレン（POE）アルキルエーテル、POEアルキルフェニルエーテル、POEジアルキルフェニルエーテル、POEアルキルアミン、ジアルキルスルホサクシネート等の湿潤剤、アルキルサルフェート、POEアルキルエーテルサルフェート、POEアルキルフェニルエーテルサルフェート、POEベンジル化（あるいはサルチル化）フェニル（またはフェニルフェニル）エーテルサルフェート、パラフィン（アルカン）スルホネート、アルファオレフィンスルホネート（AOS）、アルキルベンゼンスルホネート、モノまたはジアルキルナフタレンスルホネート、ナフタレンスルホネート・ホルマリン縮合物、アルキルジフェニルエーテルジスルホネート、リグニンスルホネート、POEアルキルエーテルスルホコハク酸ハーフエステル、POEベンジル（あるいはスチリル化）フェニル（またはフェニルフェニル）エーテルフォスフェート等の分散剤、パラオキシ安息香酸誘導体、サリチルアニライド、1, 2-ベンズイソチアゾリン-3-オン、テトラフタロニトリル（TPN）、2-ニトロプロモ等の防黴剤を添加して用いられる。

また、SDS 502株及び／またはSDS 502株産生結晶蛋白質を単一の有効成分とするのではなく、他の有害生物に有効な除草剤、各種殺虫剤、殺菌剤、植物生長調節剤または効果を助長させる共力剤、誘引剤さらには他の効用を目的とする植物栄養剤、肥料等を混合することも可能である。

SDS 502株及び／またはSDS 502株産生結晶蛋白質を有効成分とした有害生物防除剤の作成に当たりその有効成分含有量は、10～99%、

好ましくは40～90%程度が適当であるが、対象有害生物、栽培作物、使用方法、使用時期等に応じて、有効成分含有量は調整される。

また本発明の結晶性蛋白質としては、配列番号1で示されたアミノ酸を有するもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号1の配列中、  
5 生物活性の発現に必要な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、およびその一部に他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは1～6  
10 種類（例えば、Metは1種類、Leuは6種類）知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくDNAの塩基配列を変えることができる。

本発明の方法で防除し得る害虫としては以下の鞘翅目（Coleoptera）害虫が挙げられる。すなわち、ドウガネブイブイ（Anomala cuprea）、ウスチャ  
15 コガネ（Anomala diversa）、ヒラタアオコガネ（Anomala octiescostata）、アシナガコガネ（Hoplia communis）、ヒメアシナガコガネ（Ectinohoplia obducta）、セマダラコガネ（Anomala orientalis）、オオサカスジコガネ（Anomala osakana）、スジコガネ（Anomala testaceipes）、チビサクラコガネ（Anomala schonfeldti）、ヒメコガネ（Anomala rufocuprea）、アオドウガネ  
20 （Anomala albopilosa）、アカビロウドコガネ（Maladera castanea）、コフキコガネ（Melolontha japonica）、コイチャコガネ（Adoretus tenuimaculatus）、マメコガネ（Popillia japonica）等のコガネムシ類、ニジュウヤホシテントウ（Epilachna vigintioctopunctata）、オオニジュウヤホシテントウ（Epilachna vigintioctomaculata）等のテントウムシ類、イネミズゾウムシ（Lissorhoptrus oryzophilus）、サビヒョウタンゾウムシ（Scepticus griseus）、アリモドキゾウムシ（Cylas formicarius）、シバオサゾウムシ（Sphenophrus venatus vestius）、コクゾウムシ（Sitophilus zeamais）等

のゾウムシ類、キスジノミハムシ (*Phyllotreta striolata*)、ウリハムシ (*Aulacophora femoralis*) 等のハムシ類、オキナワカンシャクシコメツキ (*Melanotus okinawaensis*) 等のコメツキムシ類、マツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus*)、ゴマフカミキリ (*Mesosa myops*) 等のカミキリムシ類、ニホンキクイムシ (*Scolytus japonicus*)、ハンノキキクイムシ (*Xylosandrus germanus*) 等のキクイムシ類、及びチャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*)、コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) 等のゴミムシダマシ類である。

SDS 502 株及び／または SDS 502 株産生結晶蛋白質を有効成分とした有害生物防除剤を用いる本発明の有害生物防除方法は、鞘翅目害虫が加害する広範囲の植物を保護するために使用することができる。対象となる植物の具体例としては、ハクサイ、カンラン等に代表される野菜類、カリフラワー等の果菜類、サツマイモ、里芋等の根菜類、柑橘、落葉果樹、イネ、小麦、豆類等の穀類、ゴルフ場、庭園等における芝生、茶、サトウキビ等の特用作物、貯穀、貯蔵食品及び花樹である。また、植林地及び公園等の非農耕地の樹木等や森林の樹木及び苗木等にも使用可能である。

一般に SDS 502 株及び／または SDS 502 株産生結晶蛋白質を有効成分とした有害生物防除剤を用いて鞘翅目害虫による虫害から植物を保護する方法は、害虫が蔓延した植物または蔓延しそうな植物を、水等の希釈剤で希釈した上記の有害生物防除剤組成物で処理する（例えば散布する）ことにより、または希釈を行わず直接土壌に混和あるいは注入することにより実施される。

SDS 502 遺伝子は、SDS 502 株から単離することが可能である。1つまたはそれ以上の制限酵素を用いて SDS 502 株の全 DNA を消化し、産生された DNA 断片を 2～5 kbp の DNA 画分とする。このような画分を好適なベクターに連結し、これにより大腸菌を形質転換する。次に、SDS 502 株が産生する殺虫性結晶蛋白質に対する抗体を用いてエンザイムイ

ムノアッセイ法を行い、目的遺伝子を保持した大腸菌形質転換体を得ることができる。

5 こうして得られたSDS 502由来の結晶蛋白質遺伝子DNAを、好適な制限酵素で処理し、得られたDNA断片を好適なクローニングベクターに連結し、遺伝子カセットを作製し、大腸菌や枯草菌などの微生物を形質転換することができる。例えば、大腸菌を形質転換し、ダイデオキシ法等の遺伝子解析法などにより、SDS 502株産生結晶蛋白質をコードする塩基配列を解析することができる。

10 この遺伝子カセットを用いて殺虫活性を有するグラム陽性細菌、たとえばバチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) や他の亜種を形質転換することもできる。それにより、より広範囲の昆虫を防除するのに有効な形質転換されたバチルス・チューリングエンシス (Bacillus thuringiensis) を得ることができる。

15 さらに植物中でSDS 502遺伝子を発現させるために、好適制限部位を導入し、各遺伝子または遺伝子部分の側面に位置させ、特定部位の突然変異誘発を行うこともできる。

そしてSDS 502株の殺虫性結晶蛋白質の有効部分をコードするSDS 502遺伝子部分は、単一な植物細胞の核ゲノム中に安定に挿入され、昆虫耐性あるいは殺昆虫性の能力を持つ形質転換植物を作ることができる。

20 その結果、得られた形質転換植物を用いて、同一の特徴を有する形質転換された植物を生産することができ、さらには同一または関連の植物種の他の変種に昆虫耐性あるいは殺昆虫性の能力を持つSDS 502遺伝子部分を導入できる。形質転換植物から得られる種子は安定したゲノム挿入物であり、殺虫剤として有効な昆虫耐性あるいは殺昆虫性を発揮し得るSDS 502遺伝子部分を含有する。

25 SDS 502株はさらに、1つまたはそれ以上の殺虫活性を持った外来Bt遺伝子で形質転換することができる。例えば、SDS 502株及び／また



はSDS 502株産生結晶蛋白質が活性を示さない他の有害生物として、特に鱗翅目幼虫が挙げられるが、これに対して有効な活性を示す他の微生物由来の結晶蛋白質をコードした遺伝子とのキメラ遺伝子を作成し、より殺虫スペクトラムの広い微生物へ形質転換させることもできる。これにより、より  
5 広範囲の害虫を駆除することができる形質転換SDS 502株が産生される。

またSDS 502株結晶蛋白質を用いて、モルモットに対し免疫し、この結晶蛋白質に特異的な抗体を調製することができる。

発明を実施するための最良の形態

10 以下、本発明を実施例に基づいて本発明を説明するが、本発明は下記の例に何等限定されるものではない。

実施例1：バシルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502株の単離

15 つくば市内で採取した土壌から以下の手法を用いてバシルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502株を単離した。

試料土壌10mgを三角フラスコに入れ10mLの滅菌水を注入し30分間振盪した後、暫時静置した。その上澄み液2mLをとり、直ちに80℃で  
20 10分間加熱した。加熱液を10倍及び100倍に2段階希釈し、各々1mLの希釈液をNB平板培地（肉エキス0.3%，ペプトン1.0%，NaCl 0.5%，寒天2%，pH7.0／蒸留水）上で、24～48時間30℃で培養した。

得られたコロニーのうち、白色で、コロニーの縁がラフで、素早く成長しているものを選択することでバシルス・チューリンゲンシス (B. thuringiensis) が高い確率で得られた。  
25

実施例 2 : バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株の細菌学的性質

方法 : Cowan. S. T. 著 (坂崎利一訳、近代出版)「医学細菌同定の手引き」に記載の分類学、細菌学的手法にしたがって調査を行った。

- 5        グラム染色性 : グラム陽性桿菌、  
         コロニーの形態 : 不規則縁を有する不透明ペーリュ色のコロニーを形成、  
         胞子形成能およびその形状 : (+) 卵形胞子、  
         カタラーゼ : (+)、  
         栄養細胞の幅 : 0.9  $\mu$  以上、  
10        A M C の産生 : (+)、  
         呼吸 : 通性嫌気性、  
         D - マンニトールの資化 : (-)、  
         結晶蛋白質の存在 : (+)、  
         鞭毛の血清型 : H 抗血清型 (5 a 5 b)  
15        細胞内含有物 : 胞子形成細胞は不定型結晶蛋白質を作る (図 1 参照)、  
         アルカリ可溶性蛋白 : (+) 130 k D a 付近に泳動される蛋白質 (図  
2 参照)

         活性 : 本菌株は供試した鞘翅目害虫に対し致死活性を有する。

- 以上の事実から、本菌株を新規菌株と判断し、これをバチルス・チューリ  
20        ンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galle  
riae) S D S 5 0 2 と命名し、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所  
(現、独立行政法人産業技術総合研究所) に受託番号 F E R M P - 17979  
として寄託され、2001 年 7 月 16 日に国際寄託 (受託番号 : F E R M B P  
- 7 6 6 7) に移管されている。

25

実施例 3 : バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 の亜種の決定

鞭毛抗原に由来する抗体を用いたセロタイピングバチルス属菌の持つ鞭毛の蛋白に対する抗体を用いて、未知の菌の鞭毛タンパク質を抗原として抗原抗体反応を行った。

鞭毛H血清の調整は、菌体抗原は100℃で加熱して鞭毛を剥離し調整した。既に知られているバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) 40種類(亜種)のH抗原基準株を用い、クライギー (Craigie) 管 (0.5%半流動寒天培地) を用いて運動性の良好な細菌を選択し、それを用いてホルマリン死菌を作製し、これを家兎に免疫した。H血清はそれぞれの抗血清から相応するバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) 菌体抗原に対する抗体を吸収して調整した。H抗原の血清型とH血清の凝集素価は、大庭, 鮎沢の方法 (I. Invertebr. Pathol., 32, 303-309, 1978) によって同定、定量した。

バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502株に対するH血清は、セロバー・ガレリア (serovar galleriae) のみを特異的に凝集した。セロバー・ガレリア (serovar galleriae) SDS502株H血清の相応するホモの抗原に対する凝集素価は、12,800倍であり、セロバー・ガレリア (serovar galleriae) HD8株(基準株)に対する凝集素価は6,400倍であった。従って、SDS502株とセロバー・ガレリアは同一の菌種と判断される。

20

#### 実施例4：SDS502株結晶蛋白質の精製と特性

SDS502株を一白金耳とり、5mlの普通ブイヨン培地(肉エキス0.3%, ペプトン1.0%, NaCl 0.5%, pH7.0 / 蒸留水)を含んだ試験管に植菌し、30℃で24時間往復振盪培養を行い種培養液を得た。種培養液を終濃度1%となるように100mLの上記培地を含んだ500mL容三角フラスコに植菌し、30℃で96時間、250rpmで回転振盪培養を行った。次いで、細胞、孢子及び結晶蛋白質を遠心分離によって回収し

た。得られた沈殿に適量の緩衝液 (Tris-HCl, NaCl, EDTA) を加え超音波破碎を行い、懸濁液を得た。得られた懸濁液を 8% SDS-PAGE ゲル電気泳動にかけ泳動パターンを調べた。また、抗体を用いてウエスタンブロッティングもおこなった。その結果、SDS 502 株の産生  
5 する分子量約 130 kDa の結晶蛋白質が存在することが分かった。

実施例 5 : SDS 502 株のドウガネブイブイ (Anomala cuprea)、マメコガネ (Popillia japonica)、セマダラコガネ (Anomala orientalis)、コナガ (Plutella xylostella)、カイコガ (Bombyx mori) に対する殺虫活性

10 実施例 4 で調製した懸濁液を結晶蛋白質濃度が  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように希釈し、展着剤を添加して試料溶液とした。この試料溶液を予め滅菌処理しておいた腐葉土に混和し、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea) 1 令、2 令、3 令幼虫、マメコガネ (Popillia japonica) 1、2 令幼虫、セマダラコガ (Anomala orientalis) 1、2 令幼虫をそれぞれ放虫した。

15 また、この試料溶液中にキャベツの葉を浸し、その後これを十分に風乾し、湿った濾紙を入れたスチロールカップに入れた。この中に、3 齢中期のコナガ (Plutella xylostella) 幼虫を放虫し、7 日後 (カイコは 5 日後、コナガは 2 日後) の幼虫の死虫率を下記の計算式から求めた。なお、試験は 5 連 1 区 5 頭制で行った。

20 
$$\text{死虫率 (\%)} = (\text{死虫数} / \text{放虫数}) \times 100$$

また、この試料溶液を人工飼料 5 g 中に混入し、シャーレに入れた。この中に、3 齢 2 日目のカイコガ (Bombyx mori) 幼虫を放虫し、7 日後 (カイコは 5 日後、コナガは 2 日後) の幼虫の死虫率を上記の計算式から求めた。なお、試験は 5 連 1 区 5 頭制で行った。対象としてバチルス・チューリング  
25 ンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) HD 8 株 (基準株) の生産する殺虫性蛋白の試料溶液を同様に作成して比較を行った。

その結果、バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 の生産する結晶蛋白の殺虫スペクトル (表 1) に示したように、SDS 502 株の生産する殺虫性蛋白質は、鞘翅目昆虫のドウガネブイブイ (Anomala cuprea Hope)、セマダラコガネ (Anomala orientalis)、マメコガネ (Popillia japonica) に対して  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で殺虫効果を示したが、バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア HD 8 株 (基準株) の生産する殺虫性蛋白は殺虫活性を示さなかった。一方、HD 8 株 (基準株) は、鱗翅目昆虫のカイコ (Bombyx mori)、コナガ (Plutella xylostella) 及びハスモンヨトウ (Spodoptera litura) 幼虫に高い活性を示すが、SDS 502 株はコナガ以外の鱗翅目昆虫に対しては活性を示さなかった。これらの結果より、ガレリア基準株が *cry1Ab* 遺伝子をもち、鱗翅目に殺虫効果があるのに対し、SDS 502 株は鱗翅目に殺虫効果がほとんど無いことから、これらの結晶蛋白質が異なる組成を持っていることが示唆され、両株は全く同一の菌株とは言えないことが明らかとなった。

表 1

昆虫名	結晶蛋白質 (10 $\mu$ g) を摂食させたとき7日後の死亡率 (%)	
	<u>Bacillus thuringiensis serovar galleriae</u>	
	SDS 502株	HD 8株 (基準株)
ドウガネ幼虫 (1令幼虫)	100	0
ドウガネ幼虫 (2令幼虫)	100	0
ドウガネ幼虫 (3令幼虫)	80	0
マメコガネ (1令幼虫)	100	0
マメコガネ (2令幼虫)	100	0
セマダラコガネ (1令幼虫)	100	0
セマダラコガネ (2令幼虫)	100	0
カイコ*	0	80
コナガ**	40	80
ハスモンヨトウ	0	40

\* 5 日後に調査、 \*\* 2 日後に調査

- 5 実施例 6 : バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 株の殺虫活性蛋白質に関する遺伝子

バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 株の産生する約 130 kDa の結  
 10 晶蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用い、SDS 502 株結晶蛋白質をコードする遺伝子 (以下 SDS 502 遺伝子と略記) をクローニングした。得られた遺伝子は、3690塩基を有し、187番目のATGコドンから、3688番目のTAAコドンまでの翻訳領域を含む。更に、公知の鞘翅目昆虫に活性を示すヤポネンシスブイブイ (japonensis buibui) 遺伝子 (特開  
 15 平6-65292号) 及びヤポネンシスN141 (japonensis N141) 遺伝子 (特開

平8-228783号)との比較の結果、両遺伝子は、アミノ酸配列でそれぞれ71%、42%の相同性しか有していなかった。

#### 実施例7：SDS502遺伝子の単離とそのクローニング

- 5 SDS502株から得られた全DNAを調製し、制限酵素EcoRIで部分的に切断した。切断したDNAより約2～5kbpのDNA断片を分画し、EcoRIで切断したファージベクター(λgt11)に連結し、これにより大腸菌を形質転換した。次に、組み換え大腸菌クローンを、SDS502株結晶蛋白質と考えられる約130kDaの蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用いて抗体スクリーニングすることにより、SDS502遺伝子
- 10 を含有するクローンを確認した。この組み換え大腸菌クローンからDNAを調製し、制限酵素EcoRIで切断した。切断DNA断片を0.8%アガロースゲルで電気泳動することにより約3.4kbpの挿入DNA断片を確認した。
- 15 得られたDNA断片を分画し、EcoRI切断したプラスミドベクターであるBluescript IISK(+)に連結し、遺伝子カセット(pSDS502)を作成した(図3)。pSDS502は、完全長ではなかったため、再度クローニングを行った後、ダイデオキシ法により完全長のSDS502遺伝子を含有するDNA断片のDNA塩基配列を決定した。

20

#### 実施例8：大腸菌(E. coli:DH5α)でのSDS502結晶蛋白質の発現と発現蛋白の特性

- SDS502遺伝子を用い結晶蛋白質を生産させるために、上記実施例で作製した遺伝子カセット(pSDS502)を用い大腸菌(E. coli:DH5α)を形質転換し、組み換え大腸菌(以下、E. coli:DH5α(pSDS502)と記載する。)を得た。該組み換え大腸菌を、LB-amp液体培地(Trypton10g、NaCl10g、酵母エキス(Yeast extra
- 25

ct) 5 g、グルコース (Glucose) 0.2%、アンピシリン (Ampicillin) 50 mg/滅菌水 1 L) を用いて 37℃ で約 3 時間培養した後、終濃度 1 mM となるようにイソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) を添加し、さらに 37℃ で 20 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、  
5 沈殿に (Lysisbuffer) を 4 倍量 (W/V) 添加し、室温で 10 分間懸濁し、次いでリゾチーム (Lysozyme) を終濃度 1 mg/mL になるよう添加し、混和後 10 分間氷上で静置した。さらに、Triton X-100 を終濃度 1 % になるように添加し、混和後、室温で 10 分間静置した。次いで遠心分離し、上清部分を回収した。得られた上清を 8 % SDS-PAGE ゲル電気泳動にかけ泳動パターンを調べた。また抗体を用いてウエスタンブロッティングもおこなった。その結果、E. coli : DH5α (pSDS502) が  
10 crySDS502 結晶蛋白質を産生していることが確認された。

実施例 9 : E. coli : DH5α (pSDS502) 由来の結晶蛋白質の  
15 ドウガネブイブイ (Anomala cuprea) ならびに、マメコガネ (Popilliae japonica) 1 令幼虫に対する殺虫活性

得られた上清溶液を結晶蛋白質濃度が 10 μg/mL となるように希釈し、展着剤を添加して試料溶液とした。この試料溶液を予め滅菌処理しておいた腐葉土に混和し、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea) およびマメコガ  
20 ネ (Popilliae japonica) 1 令を放虫した。その結果、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea) およびマメコガネ (Popilliae japonica) に対する殺虫活性が確認された。

#### 産業上の利用可能性

25 本発明により、鞘翅目幼虫に対する高い殺虫性毒素蛋白質を産生する能力を有する新規微生物バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502 株を見出し、その



- 殺虫性結晶蛋白質をコードする遺伝子及び殺虫性結晶蛋白質を見出した。また該蛋白質を有効成分として含有することを特徴とする有害生物防除剤を製剤化することで、従来のBt剤に抵抗性の生じた有害生物に対して活性を有する有害生物防除剤を供給できた。特に本発明の有害生物防除剤は、シバ、
- 5 サトイモ、サツマイモ、ラッカセイ等の大害虫であるドウガネブイブイの幼虫やシバ草害虫であるセマダラコガネ、マメコガネなどの害虫に対し、従来の化学合成殺虫剤や亜種ヤポネンシスに属するブイブイ株等に比べ、効果、価格面でより有効なものとなる。

## 請求の範囲

1. 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し、殺虫活性を示す結晶性蛋白質。
- 5 2. 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置換された配列を有し、殺虫活性を示す蛋白質。
3. 請求の範囲 1 記載の蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA。
- 10 4. 配列番号 3 に示す塩基配列を含む請求の範囲 3 に記載の DNA。
5. 請求の範囲 2 に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA。
6. 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する、(1-1) バ  
15 チルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株、(1-2) その変異株、(1-3) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA で形質転換された微生物を含むか、または(2-1) 前記 S D S 5 0 2 株、(2-2)  
20 ) その変異株または(2-3) 形質転換された微生物が生産する殺虫活性を有する蛋白質を含むことを特徴とする有害生物防除剤。
7. 請求の範囲 5 に記載の DNA を用いて形質転換され請求の範囲 2 に記載の殺虫活性を示す蛋白質を生産する微生物。
- 25 8. 請求の範囲 3 または請求の範囲 5 に記載の DNA を用いて形質転換された植物またはその種子。

9. 請求の範囲 1 または 2 記載の蛋白質を有害生物に摂食させることにより、その有害生物により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。

5 10. 請求の範囲 9 記載の有害生物が鞘翅目害虫であり、その害虫により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。

11. 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し殺虫活性を示す蛋白質を生産するバチルス・チューリングェンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株。

10

## 要約書

本発明に係る有害生物防除剤は従来のB t 剤に抵抗性を生じた害虫に対して効果があり、かつこれまで数種類しか報告されていない鞘翅目害虫にたい  
5 して活性を有する。

有害生物防除剤の有効成分となる殺虫活性を有する蛋白質を産生する新規微生物バシルス・チューリングス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株、その株の産生する殺虫活性を有する蛋白質及びその蛋白質を構成するアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付  
10 加、欠失または置換された配列を有し、同様の殺虫活性を示す蛋白質、それら殺虫活性を有する蛋白質をコードするDNA、そのDNAを用いて形質転換された微生物、そのDNAを用いて形質転換された植物及びその種子、並びに有害生物防除剤及び防除方法。

图 1

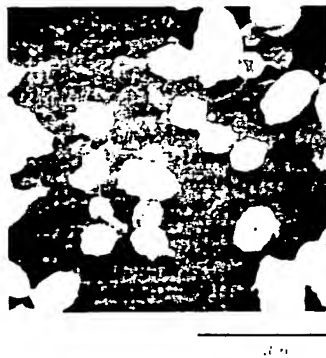
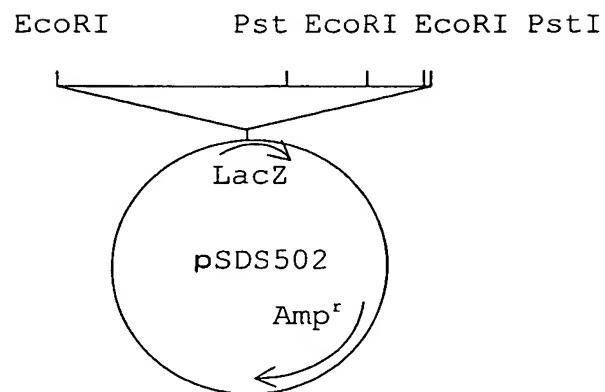


图 2



图 3



# SEQUENCE LISTING

<110> ASANO Shinichiro et al.

<120> Protein Having Insecticidal Activity, DNA Coding Said Protein, Pest Control Agent and Pest Control Method

<130> BOF-3887PCT

<150> JP 2000-236140

<151> 2000-08-03

<160> 3

<210> 1

<211> 1167

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 1

Met	Ser	Pro	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Ser	Ser
1				5				10						15	

Ser	Thr	Ser	Val	Ser	Asp	Asn	Ser	Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	Ala	Asn	Asp
			20					25						30	

Gln	Thr	Thr	Thr	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Arg	Met
			35				40							45	

Ser	Glu	Gly	Glu	Asn	Pro	Glu	Leu	Phe	Gly	Asn	Pro	Glu	Thr	Phe	Ile
			50				55					60			

Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Gly	Ile	Gly	Ile	Val	Gly	Gln	Val	Leu
			65			70				75					80

Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ala	Gly	Gln	Ile	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser
				85						90				95	

Phe Ile Val Gly Gln Leu Trp Pro Ser Ser Thr Val Ser Val Trp Glu  
100 105 110

Met Ile Met Lys Gln Val Glu Asp Leu Ile Asp Gln Lys Ile Thr Asp  
115 120 125

Ser Val Arg Lys Thr Ala Leu Ala Gly Leu Gln Gly Leu Gly Asp Gly  
130 135 140

Leu Asp Val Tyr Gln Lys Ser Leu Lys Asn Trp Leu Glu Asn Arg Asn  
145 150 155 160

Asp Thr Arg Ala Arg Ser Val Val Val Thr Gln Tyr Ile Ala Leu Glu  
165 170 175

Leu Asp Phe Val Ala Lys Ile Pro Ser Phe Ala Ile Ser Gly Gln Glu  
180 185 190

Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu  
195 200 205

Leu Leu Arg Asp Ala Ser Ile Phe Gly Ala Glu Trp Gly Phe Thr Pro  
210 215 220

Gly Glu Ile Ser Thr Phe Tyr Asp Arg Gln Val Thr Arg Thr Ala Gln  
225 230 235 240

Tyr Ser Asp Tyr Cys Val Lys Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Lys Leu  
245 250 255

Lys Gly Thr Asn Ala Ala Ser Trp Leu Lys Tyr His Gln Phe Arg Arg  
260 265 270

Glu Met Thr Leu Leu Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr  
275 280 285

Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Glu Thr Thr Ala Gln Leu Thr Arg Glu

290	295	300	
Val Tyr Thr Asp Pro Ile	Val Phe Asn Arg Glu Thr Ser Gly Gly Phe		
305	310	315	320
Cys Arg Arg Trp Ser Leu Asn Ser Asp Ile Ser Phe Ser Glu Val Glu			
	325	330	335
Ser Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Ser Glu Ile			
	340	345	350
Glu Phe Tyr Thr Thr Arg Ala Gly Leu Pro Leu Asn Asn Thr Glu Tyr			
	355	360	365
Leu Glu Tyr Trp Val Gly His Ser Ile Lys Tyr Lys Asn Thr Asn Ala			
	370	375	380
Ser Ser Ala Leu Glu Arg Asn Tyr Gly Thr Ile Thr Ser Asn Lys Ile			
385	390	395	400
Lys Tyr Tyr Asp Leu Ala Asn Lys Asp Ile Phe Gln Val Arg Ser Leu			
	405	410	415
Gly Ala Asp Leu Ala Asn Tyr Tyr Ala Gln Val Tyr Gly Val Pro Tyr			
	420	425	430
Ala Ser Phe Thr Leu Leu Asp Lys Asn Thr Gly Ser Gly Ser Val Gly			
	435	440	445
Gly Phe Thr Tyr Ser Lys Pro His Thr Thr Met Gln Val Cys Thr Gln			
	450	455	460
Asn Tyr Asn Thr Ile Asp Glu Ile Pro Pro Glu Asn Glu Pro Leu Ser			
465	470	475	480
Arg Gly Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Thr Ser Tyr Ser Phe Ser			
	485	490	495



Lys Asn Ala Ser Ser Pro Ala Arg Tyr Gly Asn Leu Pro Val Phe Ala  
500 505 510

Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Val Thr Asn Thr Val Tyr Ser Asp Lys  
515 520 525

Ile Thr Gln Ile Pro Val Val Lys Ala His Thr Leu Val Ser Gly Thr  
530 535 540

Thr Val Ile Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asn Ile Leu Lys Arg  
545 550 555 560

Thr Ser Ser Gly Pro Leu Ala Tyr Thr Ser Val Ser Val Lys Ser Pro  
565 570 575

Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn  
580 585 590

Leu Arg Leu Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Arg Ile Tyr Ser Ile Asn  
595 600 605

Val Asn Lys Thr Met Asn Lys Gly Asp Asp Leu Thr Phe Asn Thr Phe  
610 615 620

Asp Leu Ala Thr Ile Gly Thr Ala Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ser Asp  
625 630 635 640

Ser Leu Thr Val Gly Ala Asp Ser Phe Ala Ser Gly Gly Glu Val Tyr  
645 650 655

Val Asp Lys Phe Glu Leu Ile Pro Val Asn Ala Thr Phe Glu Ala Glu  
660 665 670

Glu Asp Leu Asp Val Ala Lys Lys Ala Val Asn Gly Leu Phe Thr Ser  
675 680 685

Lys Lys Asp Ala Leu Gln Thr Ser Val Thr Asp Tyr Gln Val Asn Gln  
690 695 700

Ala Ala Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Leu Tyr Pro Asn Glu  
705 710 715 720

Lys Arg Met Leu Trp Asp Ala Val Lys Glu Ala Lys Arg Leu Val Gln  
725 730 735

Ala Arg Asn Leu Leu Gln Asp Thr Gly Phe Asn Arg Ile Asn Gly Glu  
740 745 750

Asn Gly Trp Thr Gly Ser Thr Gly Ile Glu Val Ala Glu Gly Asp Val  
755 760 765

Leu Phe Lys Asp Arg Ser Leu Arg Leu Thr Ser Ala Arg Glu Ile Asp  
770 775 780

Thr Glu Thr Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Gln Ile Asp Glu Ser Leu  
785 790 795 800

Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Phe Ile Gly Ser Ser  
805 810 815

Gln Asp Leu Glu Ile Lys Leu Ile Arg His Arg Ala Asn Gln Ile Val  
820 825 830

Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Leu Pro Asp Val Leu Pro Val Asn Ser  
835 840 845

Cys Gly Gly Ile Asp Arg Cys Ser Glu Gln Gln Tyr Val Asp Ala Asn  
850 855 860

Leu Ala Leu Glu Asn Asn Gly Glu Asn Gly Asn Met Ser Ser Asp Ser  
865 870 875 880

His Ala Phe Ser Phe His Ile Asp Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Glu  
885 890 895

Asn Thr Gly Ile Trp Val Val Phe Lys Ile Pro Thr Thr Asn Gly Tyr

900	905	910
Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val Glu Glu Gly Pro Leu Ser Gly		
915	920	925
Glu Thr Leu Glu Arg Ala Gln Gln Gln Glu Gln Gln Trp Gln Asp Lys		
930	935	940
Met Ala Arg Lys Arg Gly Ala Ser Glu Lys Ala Tyr Tyr Ala Ala Lys		
945	950	955 960
Gln Ala Ile Asp Arg Leu Phe Ala Asp Tyr Gln Asp Gln Lys Leu Asn		
965	970	975
Ser Gly Val Glu Met Ser Asp Met Leu Ala Ala Gln Asn Leu Val Gln		
980	985	990
Ser Ile Pro Tyr Val Tyr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ile Pro Gly Met		
995	1000	1005
Asn Tyr Thr Ser Phe Thr Glu Leu Thr Asn Arg Leu Gln Gln Ala Trp		
1010	1015	1020
Asn Leu Tyr Asp Leu Arg Asn Ala Ile Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn		
1025	1030	1035 1040
Gly Leu Ser Asp Trp Asn Ala Thr Ser Asp Val Asn Val Gln Gln Leu		
1045	1050	1055
Ser Asp Thr Ser Val Leu Val Ile Pro Asn Trp Asn Ser Gln Val Ser		
1060	1065	1070
Gln Gln Phe Thr Val Gln Pro Asn Tyr Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr		
1075	1080	1085
Ala Arg Lys Glu Gly Val Gly Asp Gly Tyr Val Ile Ile Arg Asp Gly		
1090	1095	1100

Ala Asn Gln Thr Glu Thr Leu Thr Phe Asn Ile Cys Asp Asp Asp Thr  
 1105 1110 1115 1120

Gly Val Leu Ser Ala Asp Gln Thr Ser Tyr Ile Thr Lys Thr Val Glu  
 1125 1130 1135

Phe Thr Pro Ser Thr Glu Gln Val Trp Ile Asp Met Ser Glu Thr Glu  
 1140 1145 1150

Gly Val Phe Asn Ile Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Glu Glu Glu  
 1155 1160 1165

<210> 2

<211> 3504

<212> DNA

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (3501)

<400> 2

atg agt cca aat aat caa aat gaa tat gaa att cta gat gct tca tca 48  
 Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Leu Asp Ala Ser Ser  
 1 5 10 15

tct act tct gta tcc gat aat tct gtt aga tac cct tta gca aac gat 96  
 Ser Thr Ser Val Ser Asp Asn Ser Val Arg Tyr Pro Leu Ala Asn Asp  
 20 25 30

caa acg acc aca tta caa aac atg aac tat aaa gat tat ctg aga atg 144  
 Gln Thr Thr Thr Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Arg Met  
 35 40 45

tct gag gga gag aat cct gaa tta ttt gga aat ccg gag acg ttt att 192

Ser	Glu	Gly	Glu	Asn	Pro	Glu	Leu	Phe	Gly	Asn	Pro	Glu	Thr	Phe	Ile	
50						55					60					
agt	tca	tct	acg	gtt	caa	act	gga	att	ggc	att	gtt	ggt	caa	gta	ctg	240
Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Gly	Ile	Gly	Ile	Val	Gly	Gln	Val	Leu	
65					70				75					80		
ggg	gct	tta	ggg	gtt	cca	ttt	gct	gga	cag	ata	gct	agt	ttt	tat	agt	288
Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ala	Gly	Gln	Ile	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	
				85				90					95			
ttc	att	gtc	ggc	caa	tta	tgg	cca	tca	agt	acc	gtg	agt	gta	tgg	gaa	336
Phe	Ile	Val	Gly	Gln	Leu	Trp	Pro	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Val	Trp	Glu	
		100					105					110				
atg	att	atg	aaa	caa	gtg	gaa	gat	cta	att	gat	caa	aaa	ata	aca	gat	384
Met	Ile	Met	Lys	Gln	Val	Glu	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Lys	Ile	Thr	Asp	
	115					120				125						
tct	gta	agg	aaa	aca	gcg	ctt	gca	gga	cta	caa	gga	tta	gga	gat	ggc	432
Ser	Val	Arg	Lys	Thr	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp	Gly	
	130				135				140							
tta	gac	gta	tat	cag	aaa	tca	ctt	aag	aat	tgg	ctg	gaa	aat	cgt	aat	480
Leu	Asp	Val	Tyr	Gln	Lys	Ser	Leu	Lys	Asn	Trp	Leu	Glu	Asn	Arg	Asn	
145				150				155				160				
gat	aca	aga	gct	aga	agt	gtt	gtg	gtg	acc	caa	tat	ata	gct	tta	gag	528
Asp	Thr	Arg	Ala	Arg	Ser	Val	Val	Val	Thr	Gln	Tyr	Ile	Ala	Leu	Glu	
			165					170				175				
ctt	gat	ttt	gtt	gct	aaa	atc	cca	tct	ttt	gca	ata	tct	gga	cag	gaa	576
Leu	Asp	Phe	Val	Ala	Lys	Ile	Pro	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser	Gly	Gln	Glu	
	180					185					190					
gta	cca	tta	tta	tca	gtg	tat	gca	caa	gca	gcg	aat	tta	cat	ttg	cta	624
Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Leu	
	195					200					205					

tta tta cga gat gct tcc att ttt gga gca gag tgg gga ttc aca cca	672
Leu Leu Arg Asp Ala Ser Ile Phe Gly Ala Glu Trp Gly Phe Thr Pro	
210 215 220	
gga gaa att tcc aca ttt tat gat cgt cag gtg aca cgt acc gcc caa	720
Gly Glu Ile Ser Thr Phe Tyr Asp Arg Gln Val Thr Arg Thr Ala Gln	
225 230 235 240	
tac tcg gat tat tgt gta aag tgg tat aac act ggc tta gat aaa tta	768
Tyr Ser Asp Tyr Cys Val Lys Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Lys Leu	
245 250 255	
aaa ggt acg aat gct gca agt tgg ctg aag tat cac caa ttc cga aga	816
Lys Gly Thr Asn Ala Ala Ser Trp Leu Lys Tyr His Gln Phe Arg Arg	
260 265 270	
gaa atg aca tta ctg gta tta gat tta gta gcg tta ttt cca aac tat	864
Glu Met Thr Leu Leu Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr	
275 280 285	
gac aca cgt acg tat cca atc gaa aca acg gcc caa ctt aca cgg gaa	912
Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Glu Thr Thr Ala Gln Leu Thr Arg Glu	
290 295 300	
gtg tat aca gat cca ata gta ttt aac aga gaa aca agt ggt gga ttt	960
Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Arg Glu Thr Ser Gly Gly Phe	
305 310 315 320	
tgt agg cgt tgg tca ctt aac agt gat att tct ttt tca gaa gtc gaa	1008
Cys Arg Arg Trp Ser Leu Asn Ser Asp Ile Ser Phe Ser Glu Val Glu	
325 330 335	
agc gct gta att cgt tca cca cac cta ttt gat ata ctc agt gaa ata	1056
Ser Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Ser Glu Ile	
340 345 350	
gaa ttt tat aca aca aga gcg ggg ctt ccc ttg aat aat acg gaa tac	1104

Glu Phe Tyr Thr Thr Arg Ala Gly Leu Pro Leu Asn Asn Thr Glu Tyr	
355 360 365	
ctt gaa tat tgg gta gga cat tct ata aaa tat aaa aat acg aat gcc	1152
Leu Glu Tyr Trp Val Gly His Ser Ile Lys Tyr Lys Asn Thr Asn Ala	
370 375 380	
tca tca gca tta gaa cgt aat tac ggt acg att act tct aac aaa atc	1200
Ser Ser Ala Leu Glu Arg Asn Tyr Gly Thr Ile Thr Ser Asn Lys Ile	
385 390 395 400	
aag tat tat gat tta gca aat aag gat atc ttt cag gtt cga tca tta	1248
Lys Tyr Tyr Asp Leu Ala Asn Lys Asp Ile Phe Gln Val Arg Ser Leu	
405 410 415	
ggg gcg gat tta gct aat tac tac gca cag gta tat gga gtt ccg tac	1296
Gly Ala Asp Leu Ala Asn Tyr Tyr Ala Gln Val Tyr Gly Val Pro Tyr	
420 425 430	
gct agt ttt aca ctg ctt gac aag aat aca gga tca gga tca gtt gga	1344
Ala Ser Phe Thr Leu Leu Asp Lys Asn Thr Gly Ser Gly Ser Val Gly	
435 440 445	
ggt ttt acg tac tca aaa cca cat aca act atg caa gta tgt aca caa	1392
Gly Phe Thr Tyr Ser Lys Pro His Thr Thr Met Gln Val Cys Thr Gln	
450 455 460	
aat tac aat acg att gat gaa atc cct cca gag aat gag cca ctt agt	1440
Asn Tyr Asn Thr Ile Asp Glu Ile Pro Pro Glu Asn Glu Pro Leu Ser	
465 470 475 480	
aga ggg tat agc cat aga tta tct cat atc acc tct tat tct ttt tct	1488
Arg Gly Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Thr Ser Tyr Ser Phe Ser	
485 490 495	
aag aat gct agt agt cct gct aga tat ggc aat ctc cct gta tti gct	1536
Lys Asn Ala Ser Ser Pro Ala Arg Tyr Gly Asn Leu Pro Val Phe Ala	
500 505 510	

1gg aca cat cgg agt gcg gat gtt aca aat aca gtt tat tca gat aaa	1584
Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Val Thr Asn Thr Val Tyr Ser Asp Lys	
515 520 525	
att act cag ata cca gtt gla aag gca cat act tta gtt tca ggt act	1632
Ile Thr Gln Ile Pro Val Val Lys Ala His Thr Leu Val Ser Gly Thr	
530 535 540	
act gtt att aaa ggt cct gga ttt aca gga ggc aat atc ctt aaa aga	1680
Thr Val Ile Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asn Ile Leu Lys Arg	
545 550 555 560	
aca agt agt ggt ccg tta gct tat act agt gtc tct gla aaa tca cca	1728
Thr Ser Ser Gly Pro Leu Ala Tyr Thr Ser Val Ser Val Lys Ser Pro	
565 570 575	
tta tca caa aga tat cgt gca aga ata cgt tat gct tct act act aac	1776
Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn	
580 585 590	
tta cga ctt ttt gla aca att tct gga act cgc att tac tct ata aat	1824
Leu Arg Leu Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Arg Ile Tyr Ser Ile Asn	
595 600 605	
gtt aat aaa acc atg aat aaa ggg gat gat tta aca ttt aat aca ttt	1872
Val Asn Lys Thr Met Asn Lys Gly Asp Asp Leu Thr Phe Asn Thr Phe	
610 615 620	
gac tta gca act att ggt act gct ttc aca ttt tca aat tac tcg gat	1920
Asp Leu Ala Thr Ile Gly Thr Ala Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ser Asp	
625 630 635 640	
agc tta acg gla ggt gca gat tct ttt gct tca gga gga gaa gtt tat	1968
Ser Leu Thr Val Gly Ala Asp Ser Phe Ala Ser Gly Gly Glu Val Tyr	
645 650 655	
gla gat aag ttc gaa ctt att ccg gla aat gca aca ttt gaa gca gaa	2016



Val Asp Lys Phe Glu Leu Ile Pro Val Asn Ala Thr Phe Glu Ala Glu  
660 665 670

gaa gac cta gat gtg gca aag aaa gca gta aat ggc ttg ttt acg agt 2064  
Glu Asp Leu Asp Val Ala Lys Lys Ala Val Asn Gly Leu Phe Thr Ser  
675 680 685

aaa aaa gat gcc tta cag aca agt gta acg gat tat caa gtg aat caa 2112  
Lys Lys Asp Ala Leu Gln Thr Ser Val Thr Asp Tyr Gln Val Asn Gln  
690 695 700

gcg gca aac tta gta gaa tgc cta tcc gat gag tta tac cca aat gaa 2160  
Ala Ala Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Leu Tyr Pro Asn Glu  
705 710 715 720

aaa cga atg tta tgg gat gca gtg aaa gag gcg aaa cga ctt gtt cag 2208  
Lys Arg Met Leu Trp Asp Ala Val Lys Glu Ala Lys Arg Leu Val Gln  
725 730 735

gca cgt aac tta ctc caa gat aca ggc ttt aat agg att aat gga gaa 2256  
Ala Arg Asn Leu Leu Gln Asp Thr Gly Phe Asn Arg Ile Asn Gly Glu  
740 745 750

aac gga tgg acg gga agt acg gga atc gag gtt gcg gaa gga gat gtt 2304  
Asn Gly Trp Thr Gly Ser Thr Gly Ile Glu Val Ala Glu Gly Asp Val  
755 760 765

ctg ttt aaa gat cgt tcg ctt cgt ttg aca agt gcg aga gag att gat 2352  
Leu Phe Lys Asp Arg Ser Leu Arg Leu Thr Ser Ala Arg Glu Ile Asp  
770 775 780

aca gaa aca tat cca acg tat ctc tat caa caa ata gat gaa tca ctt 2400  
Thr Glu Thr Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Gln Ile Asp Glu Ser Leu  
785 790 795 800

tta aaa cca tat aca aga tat aaa cta aaa ggt ttt ata gga agt agt 2448  
Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Phe Ile Gly Ser Ser  
805 810 815

caa gat tta gag att aaa tta ata cgt cat cgg gca aat caa atc gtc	2496
Gln Asp Leu Glu Ile Lys Leu Ile Arg His Arg Ala Asn Gln Ile Val	
820 825 830	
aaa aat gta cca gat aat ctc ttg cca gat gta ctc cct gtc aat tct	2544
Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Leu Pro Asp Val Leu Pro Val Asn Ser	
835 840 845	
tgt ggt ggg atc gat cgc tgc agt gag caa cag tat gta gac gcg aat	2592
Cys Gly Gly Ile Asp Arg Cys Ser Glu Gln Gln Tyr Val Asp Ala Asn	
850 855 860	
tta gca ctc gaa aac aat gga gaa aat gga aat atg tct tct gat tcc	2640
Leu Ala Leu Glu Asn Asn Gly Glu Asn Gly Asn Met Ser Ser Asp Ser	
865 870 875 880	
cat gca ttt tct ttc cat att gat aca ggt gaa ata gat ttg aat gaa	2688
His Ala Phe Ser Phe His Ile Asp Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Glu	
885 890 895	
aat aca gga att tgg gtc gta ttt aaa att ccg aca aca aat gga tac	2736
Asn Thr Gly Ile Trp Val Val Phe Lys Ile Pro Thr Thr Asn Gly Tyr	
900 905 910	
gca aca cta gga aat ctt gaa ttg gta gaa gag ggg cca ttg tca ggg	2784
Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val Glu Glu Gly Pro Leu Ser Gly	
915 920 925	
gaa aca tta gaa cga gca caa caa caa gaa caa caa tgg caa gac aaa	2832
Glu Thr Leu Glu Arg Ala Gln Gln Gln Glu Gln Gln Trp Gln Asp Lys	
930 935 940	
atg gca aga aaa cgt ggg gca tca gaa aaa gca tat tat gca gca aag	2880
Met Ala Arg Lys Arg Gly Ala Ser Glu Lys Ala Tyr Tyr Ala Ala Lys	
945 950 955 960	
caa gcc att gat cgt tta ttc gca gat tat caa gac caa aaa ctt aat	2928

Gln Ala Ile Asp Arg Leu Phe Ala Asp Tyr Gln Asp Gln Lys Leu Asn	
965 970 975	
tct ggt gta gaa atg tca gat atg ttg gca gcc caa aac ctt gta cag	2976
Ser Gly Val Glu Met Ser Asp Met Leu Ala Ala Gln Asn Leu Val Gln	
980 985 990	
icc att cct tac gta tat aat gat gcg tta cca gaa atc cct gga atg	3024
Ser Ile Pro Tyr Val Tyr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ile Pro Gly Met	
995 1000 1005	
aac tat acg agt ttt aca gag tta aca aat aga ctc caa caa gca tgg	3072
Asn Tyr Thr Ser Phe Thr Glu Leu Thr Asn Arg Leu Gln Gln Ala Trp	
1010 1015 1020	
aat ttg tat gat ctt cga aat gct ata cca aat gga gat ttt cga aat	3120
Asn Leu Tyr Asp Leu Arg Asn Ala Ile Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn	
1025 1030 1035 1040	
gga tta agt gat tgg aat gca aca tca gat gtg aat gtg caa caa cta	3168
Gly Leu Ser Asp Trp Asn Ala Thr Ser Asp Val Asn Val Gln Gln Leu	
1045 1050 1055	
agc gat aca tct gtc ctt gtc att cca aac tgg aat tct caa gtg tca	3216
Ser Asp Thr Ser Val Leu Val Ile Pro Asn Trp Asn Ser Gln Val Ser	
1060 1065 1070	
caa caa ttt aca gtt caa ccg aat tat aga tat gtg tta cgt gtc aca	3264
Gln Gln Phe Thr Val Gln Pro Asn Tyr Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr	
1075 1080 1085	
gcg aga aaa gag gga gta gga gac gga tat gtg atc atc cgt gat ggt	3312
Ala Arg Lys Glu Gly Val Gly Asp Gly Tyr Val Ile Ile Arg Asp Gly	
1090 1095 1100	
gcg aat cag aca gaa aca ctc aca ttt aat ata tgt gat gat gat aca	3360
Ala Asn Gln Thr Glu Thr Leu Thr Phe Asn Ile Cys Asp Asp Asp Thr	
1105 1110 1115 1120	

ggt gtt tta tct gct gat caa act agc tat atc aca aaa aca gtg gaa 3408  
 Gly Val Leu Ser Ala Asp Gln Thr Ser Tyr Ile Thr Lys Thr Val Glu  
 1125 1130 1135

ttc act cca tct aca gag caa gtt tgg att gac atg agt gag acc gaa 3456  
 Phe Thr Pro Ser Thr Glu Gln Val Trp Ile Asp Met Ser Glu Thr Glu  
 1140 1145 1150

ggt gta ttc aac ata gaa agt gta gaa ctc gtg tta gaa gaa gag taa 3504  
 Gly Val Phe Asn Ile Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Glu Glu Glu  
 1155 1160 1165

<210> 3

<211> 3690

<212> DNA

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 3

gaattctaat gacacagtag aatatittta aaataaagat ggaagggggg atatgaaaaa 60  
 tataatcaca agagtcatac aaaaagatgg ttaigttaaa acaaaaaaa cctgtaggaa 120  
 taagggttta aaagcaatcg ttigaaaaga tagttatatt aaattgtatg tataggggga 180  
 aaaaagaatga gtccaaataa tcaaaatgaa taigaaattc tagatgcctc atcatctact 240  
 tctgtatccg ataattctgt tagataccct ttagcaaacg atcaaacgac cacattacaa 300  
 aacatgaact ataaagattt tctgagaatg tctgaggag agaattccta attatttga 360  
 aatccggaga cgtttattag ttcatctacg gticaaacg gaattggcat tgttggicaa 420  
 gtactggggg ctttaggggt tccatttgct ggacagatag ctagtittta tagtttcat 480  
 gtccgtcaat tatggccaac aagtaaccgt agtgtatggg aaatgattat gaaacaagt 540  
 gaagatctaa ttgatcaaaa aataacagat tctgttaagga aaacagcgct tgcaggacia 600  
 caaggattag gagatggcct agacgtatat cagaaatcac ttaagaattg gctggaaaa 660  
 cgtaatgata caagagctag aagtgttggt gtgaccaat atatagcttt agagcttgat 720  
 ttgtttgcta aaatcccatc ttttgcaata tctggacagg aagtaccatt attatcagt 780  
 tatgcacaag cagcgaattt acatttgcta ttattacgag atgcttccat ttttggagca 840  
 gagtggggat tcacaccagg agaaatttcc acattttatg atcgtcaggt gacacgiacc 900  
 gccaatact cggattattg tgtaaagtgg tataacactg gcttagataa attaaaaggt 960

acgaatgcig caagttggct gaagtaacac caattccgaa gagaaatgac attactggta 1020  
 ttagatttag tagcgttatt tccaaactat gacacacgta cgtalccaat cgaaacaacg 1080  
 gcccaactta cacgggaagt gtatcacagt ccaatagiat ttaacagaga aacaagtgtt 1140  
 ggattitgta ggcgltggc acitaaacagt gatatttctt tticagaagt cgaaagcgct 1200  
 glaattcggt caccacacct attigatata ctacagtgaat tagaatttta tacaacaaga 1260  
 gcggggcttc ccttgaataa tacggaatac ctgaataatt ggglaggaca tictataaaa 1320  
 tataaaaaata cgaatgccic atcagcatta gaacglaatt acggtacgat tacttctaac 1380  
 aaaaatcaagt attatgattt agcaataaag gatacttctc aggttcgac attaggggag 1440  
 gatitaggta attactacgc acaggtaata ggagttccgt acgtatgtt tacactgctt 1500  
 gacaagaata caggatcagg atcagttgga ggttttacgt actcaaaacc acatataact 1560  
 atgcaagtat gtacacaaaa ttacaatacgt attgatgaaa tccctccaga gaatgagcca 1620  
 ctatgtagag ggtatagcca tagattatct catatcacct ctatttctt tictaagaat 1680  
 gctatgagtc ctgctagata tggcaatctc cctgtatttg ctggacaca tcggagtgcg 1740  
 gatgttataa atacagttaa ttacagataa attactcaga taccagtgtt aaaggcacat 1800  
 actttagttt caggtaactac tgtattaaa ggctctggat ttacaggagg caatatctt 1860  
 aaaagaacaa gtagtggctc gttagcttat actagtgtct ctgtaaaatc accattatca 1920  
 caaagataat gtagcaagaat acgttatgct tctactacta acttacgact ttttgaaca 1980  
 atttctggaa ctgcattta ctctataaat gttataaaa ccatgaataa aggggatgat 2040  
 ttaacattta atacatttga cttagcaact attggtactg ctctacatt ttcaattac 2100  
 tcggatagct taacggtagg tgcagattct ttgtcttcag gaggagaagt ttatgtatg 2160  
 aagttcgaac ttattccggt aaatgcaaca ttgaagcag aagaagacct agatgtggca 2220  
 aagaaagcag taaatggctt gtttacgagt aaaaaagaat ccttacagac aagtgtaacg 2280  
 gattatcaag tgaatcaagc ggcaaacitg gtagaatgcc tatccgatga gttataacca 2340  
 aatgaaaaac gaatgttatg ggatgcagtg aaagaggcga aacgactgt tcaggcacgt 2400  
 aacttactcc aagatacagg cttaaatagg ataatggag aaaacggatg gacgggaagt 2460  
 acgggaatcg aggttcgga aggagatgtt ctgtttaaag atcgttcgct tcgtttgaca 2520  
 agtgcgagag agattgatac agaaacatat ccaacgtatc tctatcaaca aatagatgaa 2580  
 tcacttttaa aaccatatac aagatataaa ctaaaagggt ttataggaag tagtcaagt 2640  
 ttagagattt aattaaatcg tcatcgggca aatcaaatcg tcaaaaatgt accagataat 2700  
 ctcttgccag atgtactccc tgtcaattct tgtgttgga tcgatcgctg cagtacgaa 2760  
 cagtatgtag acgcaattt agcactcgaa aacaatggag aaaatggaaa tatgtctct 2820  
 gatcccatg catcttctt ccatattgat acaggtgaaa tagatttga tgaataata 2880  
 ggaatttggg tcgtatttaa aattccgaca acaaatggat acgcaacact aggaattct 2940  
 gaattggtag aagaggggac attgtcaggg gaaacattag aacgagcaca acaacaaga 3000  
 caacaatggc aagacaaaaa ggcaagaaaa cgtggggcat cagaaaaagc atattatgca 3060  
 gcaaagcaag ccattgatcg ttatttcgca gattatcaag accaaaaact taattctgtt 3120  
 gtagaaatgt cagatatgtt ggcagcccaa aacctgtac agtccattcc ttacgtatat 3180  
 aatgatgcgt taccagaaat ccttggaaat aactatcga gttttacaga gttacaaaat 3240

agaticcaac aagcatggaa ttgtatgat cttcgaaatg ctataccaaa tggagatttt 3300  
 cgaaatggat taagtattg gaatgcaaca tcagatgiga atgtgcaaca actaagcgat 3360  
 acatcigtcc ttgtattcc aaactggaat tctcaagtg cacaacaatt tacagttaa 3420  
 ccgaattata gatatgtgtt acgtgcaca gcgagaaaag agggagtagg agacggatat 3480  
 gtagcatcc gtaggtgc gaatcagaca gaaacacica catttaatat atgtatgat 3540  
 gatacaggig tttatctgc tgaacaaat agctatatca caaaaacagt ggaattcact 3600  
 ccatctacag agcaagtig gatgacaig atgagaccg aagggtatt caacatagaa 3660  
 agttagaac tcgtttaga agaagagtaa 3690

P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

REC'D 23 NOV 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 BOF-3887PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO1/06660	国際出願日 (日.月.年) 02.08.01	優先日 (日.月.年) 03.08.00
出願人 (氏名又は名称) 浅野 眞一郎		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K14/325, C12N15/03, C12N1/19, C12N5/14, A01N63/00, A01N63/02, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K14/325, C12N15/03, C12N1/19, C12N5/14, A01N63/00, A01N63/02, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T (J O I S), S w i s s P r o t / P I R / G e n e S e q,  
M E D L I N E (S T N), G e n b a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 92/19106 A (MYCOGEN CORP) 12. 11月. 1992 (12. 11. 92) & US 5211946 A & EP 584232 A & JP 6-507177 A	1 - 1 1
X	WO 93/04587 A (MYCOGEN CORP) 18. 3月. 1993 (18. 03. 93) & US 5286485 A & EP 605586 A & JP 6-510765 A	1 - 1 1
X	EP 498537 A (MYCOGEN CORP) 12. 8月. 1992 (12. 08. 92) & JP 5-229913 A & US 5277905 A & US 5457179 A	1 - 1 1

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 1 . 1 0 . 0 1

国際調査報告の発送日

20.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4 N

9 8 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 5554534 A (MYCOGEN CORP) 10. 9月. 1996 (10. 09. 96) ファミリーなし	1 - 1 1
A	Ryoichi Sato, et. al. , , Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>japonensis</i> strain buibui toxic to scarabaeid insects. , Current Microbiology (1994) , Vol. 28, No. 1, p. 15-19	1 - 1 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06660

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K14/325, C12N15/03, C12N1/19, C12N5/14, A01N63/00, A01N63/02, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K14/325, C12N15/03, C12N1/19, C12N5/14, A01N63/00, A01N63/02, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq,  
MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92/19106 A (MYCOGEN CORP), 12 November, 1992 (12.11.92), & US 5211946 A & EP 584232 A & JP 6-507177 A	1-11
X	WO 93/04587 A (MYCOGEN CORP), 18 March, 1993 (18.03.93), & US 5286485 A & EP 605586 A & JP 6-510765 A	1-11
X	EP 498537 A (MYCOGEN CORP), 12 August, 1992 (12.08.92), & JP 5-229913 A & US 5277905 A & US 5457179 A	1-11
X	US 5554534 A (MYCOGEN CORP), 10 September, 1996 (10.09.96) (Family: none)	1-11
A	Ryoichi Sato, et al., "Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>japonensis</i> strain buibui toxic to scarabaeid insects",	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
31 October, 2001 (31.10.01)

Date of mailing of the international search report  
20 November, 2001 (20.11.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06660

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Current Microbiology (1994), Vol.28, No.1, pages 15-19	